

PCT

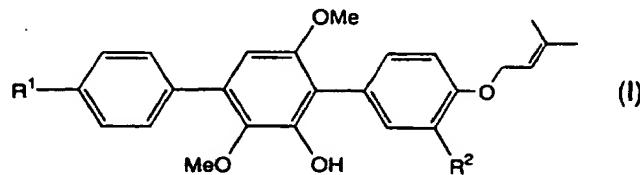
世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07C 43/23, 41/01, C12P 7/04, C12N 1/14, A61K 31/085 // (C12P 7/04, C12R 1:66) (C12N 1/14, C12R 1:66)		A1	(11) 国際公開番号 (43) 国際公開日	WO97/39999 1997年10月30日(30.10.97)		
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01261			(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 歐州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).			
(22) 国際出願日 1997年4月11日(11.04.97)			(22) 国際出願日 1997年4月11日(11.04.97)			
(30) 優先権データ 特願平8/126582 1996年4月22日 (22.04.96)		JP	(30) 優先権データ 特願平8/126582 1996年4月22日 (22.04.96)			
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 Osaka, (JP)			(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 上垣内俊行(KAMIGAUCHI, Toshiyuki)[JP/JP] 〒565 大阪府豊中市上新田1-28-K-302 Osaka, (JP)			(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 上垣内俊行(KAMIGAUCHI, Toshiyuki)[JP/JP] 〒565 大阪府豊中市上新田1-28-K-302 Osaka, (JP)			
(73) 鈴木隆二(SUZUKI, Ryuuji)[JP/JP] 〒636 奈良県生駒郡平群町線ヶ丘3-1-21 Nara, (JP)			(73) 鈴木隆二(SUZUKI, Ryuuji)[JP/JP] 〒636 奈良県生駒郡平群町線ヶ丘3-1-21 Nara, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 高山裕貴(TAKAYAMA, Hirotugu) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 Osaka, (JP)			(74) 代理人 弁理士 高山裕貴(TAKAYAMA, Hirotugu) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 Osaka, (JP)			
(54) Title: NOVEL TERPHENYL COMPOUNDS AND MEDICINES CONTAINING THE SAME						
(54)発明の名称 新規テルフェニル化合物およびそれを含有する医薬						
<p style="text-align: right;">(I)</p>						
<p>(57) Abstract Compounds represented by general formula (I), pharmaceutically acceptable salts thereof, hydrates of the compounds and the salts, processes for the production thereof, medicinal compositions comprising the same, and a microorganism belonging to the genus <u>Aspergillus candidas</u> and producing the same. In said formula R¹ represents hydrogen or hydroxy, and R² represents hydroxy or methoxy.</p>						

(57) 要約

式 (I) :



(式中、R¹は水素またはヒドロキシであり、R²はヒドロキシまたはメトキシである)

で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物およびその製造方法、本化合物を含有する医薬組成物、並びにアスペルギルス カンデイダスに属し、本化合物を產生する微生物を提供する。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

A L	アルペニア	E S	スペイン	L R	リベリア	S G	シンガポール
A M	アルメニア	F I	フィンランド	L S	レソト	S I K	スロヴェニア
A T	オーストリア	F R	フランス	L T	リトアニア	S K L	スロバキア共和国
A U	オーストラリア	G A F	ガボン	L U	ルクセンブルグ	S L N	シェラレオネ
A Z	オゼルバイジャン	G B E	英国	L V	ラトヴィア	S Z	セネガル
B A	ボズニア・エルツェゴビナ	G C H	グルジア	M C	モナコ	T D	スウェーデン
B B	バルバドス	G D M	ガーナ	M D	マルドヴァ共和国	T G	チャード
B E	ベルギー	G E M	ガンビア	M G	マダガスカル	T J	トトロジキスタン
B F	ブルギナ・ファソ	G N R	ギニア	M K	マケドニア共和国ユーゴス	T M	タルクメニスタン
B G	ブルガリア	G R U	ギリシャ	M L	ラヴィニア共和国	T R	トルコニダード・トバゴ
B J	ベナン	H U U	ハンガリー	M N	マリ	U A	トトククラン
B R Y	ブラジル	I D E	インドネシア	M R	モンゴル	U G G	米国
B Y A	ペラルーシ	I E L	アイルランド	M W	モーリタニア	S S Z	ウズベキスタン
C A	カナダ	I S L	イスラエル	M X	マラウイ	V V N	ヴィエトナム
C C F	中央アフリカ共和国	I S T	イスラブンド	N E	ニジェール	Y U U	ユーロラビア
C C G	ジンゴー	J P E	イタリア	N L	オランダ	Z W	ジンバブエ
C C H	スイス	K G E	日本	N O	ノルウェー		
C C M	スイート・ジボアール	K G P	ケニア	N Z	ニュージーランド		
C C N	カムルーン	K K P	キルギスタン	P L	ボーランド		
C C U	中国	K R P	朝鮮民主主義人民共和国	P T	ボルトガル		
C C Z	キューバ	K R Z	大韓民国	R O	ブルガニア		
D E E	デュッコ共和国	K Z C	カザフスタン	R U	ロシア連邦		
D K E	ドイツ	L C I	セントルシア	S D	ロシア連邦		
E E	デンマーク	L I K	リヒテンシャウタイン	S E	スウェーデン		
	エストニア		スリランカ				

明細書

新規テルフェニル化合物およびそれを含有する医薬

技術分野

本発明は医薬として有用な化合物とその製造方法、およびその用途に関する。詳しくは、免疫抑制作用、抗炎症作用および抗癌作用を有する新規テルフェニル化合物とその製造方法、並びにそれを含有する免疫抑制剤、抗炎症剤および抗癌剤に関する。

背景技術

近年数多く行なわれるようにになった組織、臓器等の移植手術は、機能の低下した臓器および組織の機能回復を計る手法として脚光を浴びている。しかし、術後の移植部分を排斥しようとする拒絶反応が移植手術の大きな課題であり、それを回避することが移植手術の成否を決定するといつても過言ではない。

こうした中で、免疫抑制剤は臓器または組織移植に対する拒絶反応、骨髄移植によって起こる移植片対宿主反応の予防および治療に用いられており、重要な役割を担う薬剤である。また、移植手術に伴う拒絶反応以外にも、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療およびアレルギー性疾患の治療にも多用されている。現在、アザチオプリン、コルチコイド、シクロスボリンAやタクロリムス等種々の免疫抑制剤が開発・実用化されているが、効果や副作用の点で必ずしも満足できるものではない。

一方、抗癌剤も多数が実用化されてはいるが、それらの多くは強い抗癌作用の反面、副作用としての毒性も併せ持っている為、その使用量が限定されている。

これらの状況から、強い活性を有し、かつ安全に用いることができる免疫抑制剤および抗癌剤の開発が望まれていた。

本発明化合物と同系統の化合物が、ケミカル ファーマシューティックス ピューリチン (Chemical Pharmaceuticals Bulletin)

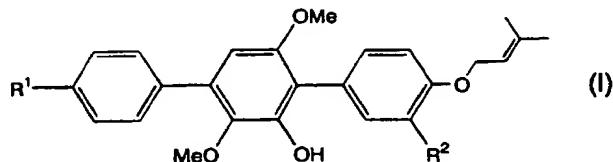
n, 24 (4), 613-620 (1976)、ザ ジャーナル オブ アンチバイオチックス (The Journal of Antibiotics, 32 (6), 559-564 (1979)) およびアグリカルチュアル バイオロジカル ケミストリー (Agricultural Biological Chemistry, 49 (3), 867-868 (1985)) 等に記載されている。これらの文献には、ウニの胚細胞やヒラ細胞に対して毒性を有することが開示されているが、免疫抑制作用、抗炎症作用及び抗癌作用については全く言及されていない。

発明の開示

本発明の目的は、優れた免疫抑制作用、抗炎症作用または抗癌作用を有する新規化合物、その製造方法およびそれを含有する免疫抑制剤、抗炎症剤または抗癌剤を提供することにある。

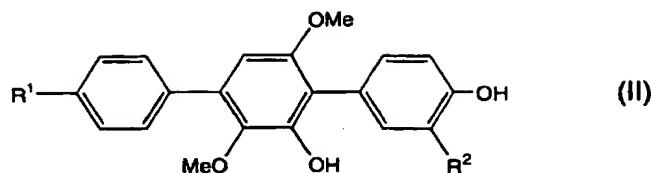
本発明者らは、糸状菌の一種であるアスペルギルス カンディダス (*Aspergillus candidus*) RF-5762 株の培養液中に強い免疫抑制作用、抗炎症作用および腫瘍細胞増殖抑制作用を有する化合物が含まれていることを見出し、その活性化合物を単離・精製し、本発明を完成した。

即ち、本発明は式 (I) :



(式中、R¹は水素またはヒドロキシであり、R²はヒドロキシまたはメトキシである。)

で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を提供するものである。また、本発明はアスペルギルス属に属し、化合物 (I) を產生し得る微生物を培養し、得られた培養物から化合物 (I) を採取することを特徴とする化合物 (I) の製造方法を提供するものである。さらに本発明は、化合物 (I) の前駆体である、式 (II) :



(式中、R¹およびR²は前記と同義である)

で示される化合物を3-メチル-2-ブテニル化することを特徴とする、化合物(I)の製造方法を提供するものである。

また、別の態様として、本発明は化合物(I)を含有する医薬、詳しくは免疫抑制剤、抗炎症剤または抗癌剤を提供する。さらに、化合物(I)を投与することを特徴とする、免疫反応の抑制の方法、炎症の治療または予防の方法および癌の治療の方法を提供する。さらに別の態様として、免疫反応の抑制、炎症の治療または予防および癌の治療のための医薬を製造するための、化合物(I)またはの使用を提供する。さらに、本発明はアスペルギルス カンディダス属に属し、化合物(I)を產生する微生物に関する。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明化合物(I)の微生物培養による製造方法および化学合成による製造方法を説明する。

微生物培養による製造方法

本微生物培養法においては、本発明化合物(I)を产生し得る微生物を通常の発酵生産に用いる培地組成、培地条件で培養し、通常の発酵生産物を分離採取する方法により化合物(I)を単離する。

本発明化合物(I)を产生し得る微生物としては、アスペルギルス属に属する微生物、例えばアスペルギルス カンディダス RF-5762株が例示される。アスペルギルス カンディダス RF-5762株は以下のようない形態学的性状を有していた。

本菌株はツアベック寒天培地上、コロニーは白色からクリーム色を呈し、偏平

で、辺縁は切裂状である。

分生子頭の生育は良好で、コロニー裏面は無色からクリーム色である。時として寒天中に茶色の色素を出す。分生子頭は直径 150～250 μm のゆるい球形で、後に裂けて分枝し、同時に直径 25～50 μm の小型分生子頭も形成される。

分生子柄は長さ 20～300 μm、直径 4.0～6.0 μm で壁面は薄く、隔壁がある。

頂のうは球形～長球形で、13.0～15.0 × 13.0～15.0 μm である。表面にメトレを形成するが、小型の分生子頭ではこれを欠き、ペニシラス状になる。

メトレは 3.5～4.5 × 6.5～7.5 μm で、ときに肥大化し、球形～洋ナシ形となり、サイズは 10.0～14.0 × 10.0～14.0 μm である。

フィアライドは 1.5～2.5 × 4.0～8.0 μm。分生子は直径 2.5～4 μm の球形で、表面は平滑である。

生育温度は 14℃～36℃ であり、至適生育温度は 22℃～32℃ である。

以上の性状を文献（ザ ジーナス アスペルギルス（The genus *Aspergillus*），347～350（1965） ウィリアムス&ウィルキンス社（Williams & Wilkins）；ジャーナル オブ ジ アンチバクテリウム アンド アンチフンガル エイジェンツ（Journal of the Antibacterium and Antifungal Agents）19（9），489～495（1991）；菌類図鑑（下），1006～1045（1977）、講談社；コンペディウム オブ ソイル フンギ リプリント（Compendium of Soil Fungi Reprint）1993，83～85）に記載されているアスペルギルス属の既知種と比較した。その結果、本菌をアスペルギルス カンディダス（*Aspergillus candidus* Link ex Link 1824）と同定した。

尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号、郵便番号305）に受託番号「FERM P-15439」として平成8年（1996年）2月15日より寄託されており、平成9年（1997

年) 3月21日に受託番号「F E R M B P - 5 8 8 2」としてブタベスト条約に基づく国際寄託に移管された。

本発明化合物(I)の生産用培地としては、炭素源、窒素源及び無機塩を適当量含有するものであれば合成培地または天然培地のいずれでも好適に用いることができる。必要に応じて、ビタミン類またはその他栄養物質を適宜加えてもよい。

炭素源としては例えば、グルコース、マルトース、フラクトース、シュークロース、デンプン等の糖類、グリセロール、マンニトール等のアルコール類、グリシン、アラニン、アスパラギン等のアミノ酸類、グルコン酸、ビルビン酸、酢酸等の有機酸、オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸およびそのグリセライド等の一般的な炭素源より微生物の資化性を考慮して1種または2種以上を適宜選択して用いればよい。

窒素源としては、大豆粉、コーンスチーブリカー、ビーフエキス、ペプトン、酵母エキス、各種アミノ酸等の有機含窒素化合物またはアンモニウム塩、硝酸塩、無機窒素化合物等が挙げられ、微生物の資化性を考慮して1種または2種以上を適宜選択して用いればよい。

無機塩としては、例えば炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸銅、塩化マンガン、硫酸亜鉛、塩化コバルト、各種リン酸塩を必要に応じて添加すれば良い。

また、消泡剤、例えば植物油、ラード、ポリプロピレングリコール等は必要に応じて添加することができる。

さらに、結晶セルロースやパルプのような固形分を培地に添加することにより、発酵を安定化することも可能である。

培養温度は微生物が発育し、本発明化合物(I)を生産する範囲で適宜変更できるが、好ましくは15℃～30℃であり、さらに好ましくは20℃～26℃である。pHは6～8付近が好ましく、培養時間は通常数日～数週間程度であるが、本発明化合物(I)の生産量が最高に達した時に培養を終了すればよい。培養方法は固相培養、通気攪拌培養等の通常用いられる方法であればいずれも好適に用い得る。なお、本培養工程では本発明化合物(I)の前駆体である化合物(II)

も同時に產生され得る。

培養物から発酵生産物を分離採取する方法には、濾過、遠心分離、各種イオン交換樹脂やその他の活性吸着剤による吸脱着やクロマトグラフィー、各種有機溶媒による抽出等を適当に組み合わせた通常の発酵生産物分離精製法を用いることができる。例えば、培養物より分離した菌体を有機溶媒（酢酸エチル、アセトン、メチルエチルケトン等）で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと高速液体カラムクロマトグラフィーを組み合わせて分離精製すればよい。

化学合成による製造方法

発酵により得られた化合物が本発明化合物（I）の前駆体である（式（I-I）で表わされる化合物である）場合には、適当な条件下、3-メチル-2-ブテニル化反応に付して本発明化合物（I）に誘導すればよい。

まず、アセトン、ジオキサン、テトラヒドロフラン等の有機溶媒を用いて前駆体を溶解し、これにアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水酸化物もしくは炭酸塩または三級アミン等の塩基性助剤を加える。ここで用いられるアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水酸化物もしくは炭酸塩としては例えば、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウムおよび炭酸カルシウム等が挙げられる。また、三級アミンとしては例えばトリエチルアミン等が挙げられる。

次いで得られた溶液に3-メチル-2-ブテニルプロマイド等の3-メチル-2-ブテニルハライドを加え、選択的に3-メチル-2-ブテニル化することにより本発明化合物（I）が得られる。

また、本発明化合物（I）の一つである、式（I）においてR¹およびR²がヒドロキシである化合物（以下化合物（I-1）とする）をアルキル化反応に付すことによりR¹がヒドロキシ、R²がメトキシである化合物（以下化合物（I-3）とする）が得られる。

具体的には、化合物（I-1）を有機溶媒に溶解し、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水酸化物もしくは炭酸塩または三級アミン等の塩基性助剤を加

える。ここで用いることができる有機溶媒、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水酸化物もしくは炭酸塩および三級アミン等の塩基性助剤は前記と同様のものが挙げられる。次いで得られた溶液にジメチル硫酸、ベンゼンスルホン酸等のメチル硫酸エステル類またはヨウ化メチルおよび臭化メチル等のメチルハライド等のメチル化剤を加えてメチル化すればよい。

本発明化合物（I）は、生成可能であり、製薬上許容される塩をも包含し、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩、カルシウム、バリウム等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。塩は通常用いられる反応を用いて形成させることができる。

また、本発明化合物（I）はその水和物をも包含し、本発明化合物1分子に対して任意の数の水分子と結合していてもよい。

本発明化合物（I）は強い免疫抑制作用および抗炎症作用を有している。具体的には、IL-2、IL-4およびIL-5のサイトカイン産生抑制作用、T、B両細胞に対する非常に強い増殖抑制作用および／または抗体産生抑制作用（例えばIgE、IgG等、特にIgE）を有する。また、腫瘍細胞増殖抑制作用も有している為、医薬としてヒトを含む動物の免疫抑制、抗炎症または腫瘍増殖抑制のために投与することができる。

免疫抑制剤または抗炎症剤としての本発明化合物（I）は、臓器または組織移植に対する拒絶反応、骨髄移植によって起こる移植片対宿主反応、アレルギー性疾患（例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎、アトピー等）、高好酸球症候群、アレルギー性結膜炎、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、皮膚筋炎、強皮症、MCTD、慢性関節リウマチ、炎症性大腸炎、虚血再灌流における傷害、花粉症、アレルギー性鼻炎、蕁麻疹および乾癬等のアレルギー性疾患の予防または治療に有用である。また、抗癌剤として種々の血液系腫瘍、固形癌等の腫瘍の治療に有用である。

本発明化合物（I）を医薬として投与する場合、経口的、非経口的のいずれでも安全に投与することができる。経口投与は常法に従って錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、液剤、シロップ剤、バッカル剤または舌下剤等の通常用いら

れる剤型に調製して投与すればよい。非経口投与は、例えば筋肉内投与、静脈内投与等の注射剤、坐剤、経皮吸収剤、吸入剤等、通常用いられるいずれの剤型でも好適に投与することができる。特に経口投与が好ましい。

本発明化合物（I）の有効量にその剤型に適した賦形剤、結合剤、湿润剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤等の各種医薬用添加剤とを必要に応じて混合し医薬製剤とすることができる。注射剤の場合には適当な担体と共に滅菌処理を行なって製剤とすればよい。

具体的には、賦形剤としては乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウムもしくは結晶セルロース等、結合剤としてはメチルセルロース、カルボキシメビロリドン等、崩壊剤としてはカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチセルロースナトリウム、デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末もしくはラウリル硫酸ナトリウム等、滑沢剤としてはタルク、ステアリン酸マグネシウムもしくはマクロゴール等が挙げられる。坐剤の基剤としてはカカオ脂、マクロゴールもしくはメチルセルロース等を用いることができる。また液剤もしくは乳濁性、懸濁性の注射剤として調製する場合には通常使用されている溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、保存剤、等張剤等を適宜添加しても良く、経口投与の場合には嬌味剤、芳香剤等を加えてても良い。

本発明化合物（I）の免疫抑制剤、抗炎症剤または抗癌剤としての投与量は、患者の年齢、体重、疾病の種類や程度、投与経路等を考慮した上で設定することが望ましいが、成人に経口投与する場合、通常 $0.05\sim100\text{mg/kg/day}$ であり、好ましくは $0.1\sim10\text{mg/kg/day}$ の範囲内である。非経口投与の場合には投与経路により大きく異なるが、通常 $0.005\sim10\text{mg/kg/day}$ であり、好ましくは $0.01\sim1\text{mg/kg/day}$ の範囲内である。これを1日1回～数回に分けて投与すれば良い。

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

実施例

実施例 1 化合物（I）の分離採取

1. 発酵工程

アスペルギルス カンディダス R F - 5 7 6 2 の発酵：グルコース 5. 0 %、コーンスチーブリカ - 5. 0 %、炭酸カルシウム 0. 2 % および水道水からなる培地 1 0 0 m l (p H 7. 0、滅菌前) を含む 5 0 0 m l 容マイヤーフラスコに、試験管に斜面培養したアスペルギルス カンディダス R F - 5 7 6 2 を植菌し、2 2 0 回転／分の回転振盪機上、2 5 ℃で 4 日間培養を行った。この培養液 4 m l ずつを、グリセリン 2. 0 %、シュークロース 2. 0 %、ビーフエキス 0. 3 %、酵母エキス 0. 2 % よりなる発酵培地 1 0 0 m l (p H 7. 0、滅菌前) を含む 5 0 0 m l 容マイヤーフラスコ 2 0 本に植菌し、1 8 0 回転／分の回転振盪機上、2 3 ℃で、1 2 日間培養した。

2. 分離・精製工程

発酵工程で得られた培養液 2 L を減圧濾過によって濁液と菌体に分けた。菌体部はアセトン 5 0 0 m l で 2 回抽出、減圧濾過後、濁液を減圧下濃縮した後、先の濁液と共に酢酸エチル抽出 (p H 6. 5 0 0 m l × 2) を行ない、水洗後減圧下溶媒を留去し粗製物質 7. 8 5 g を得た。粗製物質 7. 8 5 g を 3 0 m l のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (M e r c k K i e s e l g e l 6 0, 7 0 ~ 2 3 0 m e s h, 3 2 m m i. d. × 3 0 0 m m) に付した。クロロホルム 3 0 0 m l 、次いでクロロホルム：メタノール (2 0 : 1) 4 0 0 m l で展開し、化合物 (I - 1)、(I I - 1)、(I - 2) および (I - 3) を含む分画 Fr. 1 ~ 3 (4 2 0 m l) を集め、減圧下で濃縮乾固し粗精製物 0. 6 5 7 g を得た。

続いて溶出される Fr. 4 ~ 7 (2 8 0 m l) は化合物 (I I - 2) を含んでおり、それを濃縮乾固し、粗精製物 0. 5 7 7 g を得た。さらに、クロロホルム：メタノール (2 0 : 1. 5) 4 0 0 m l で展開し、溶出される分画 Fr. 8 ~ 9 (2 1 0 m l) より化合物 (I I - 3) 1. 6 g を、続いてさらにメタノール含量を増やしたクロロホルム：メタノール (2 0 : 1 0) 3 0 0 m l で溶出される分

画 Fr. 10 ~ 12 (160 ml) より化合物 (I - 1) を含む粗精製物 1.46 g を得た。

2-1. 化合物 (I - 1) 、 (II - 1) 、 (I - 2) 、 (I - 3) の分離

化合物 (I - 1) 、 (II - 1) 、 (I - 2) および (I - 3) を含む分画 Fr. 1 ~ 3 粗精製物 (0. 657 g) は再びシリカゲルクロマトグラフィー (Merck Kieselgel 60, 70 ~ 230 mesh, 20 mm i. d. × 350 mm) に付した。粗精製物 0. 657 g を展開溶媒トルエン : アセトニトリル (85:15) 、 5 ml に溶解し、同溶媒で展開して 5 g ずつフラクションを集めた。Fr. 13 ~ 16 に化合物 (I - 2) 、 Fr. 23 ~ 26 に化合物 (I - 3) 、 Fr. 27 ~ 33 に化合物 (I - 1) および (II - 1) がそれぞれ含まれており、各分画を濃縮乾固して 97 mg, 128 mg, 117 mg を各々得た。

2-2. 化合物 (I - 1) 、 (II - 1) の精製

化合物 (I - 1) および (II - 1) を含む 117 mg をシリカゲルクロマトグラフィー (Merck Kieselgel 60, 70 ~ 230 mesh, 20 mm i. d. × 350 mm) に付し、展開溶媒トルエン : アセトニトリル (90:10) 、 3 ml に溶解し、同溶媒で展開して 5 g ずつフラクションを集めた。Fr. 48 ~ 65 (90 ml) に化合物 (I - 1) および (II - 1) が溶出された。減圧下濃縮乾固し、 90 mg の分画を得た。次に中圧液体クロマトグラフィーにより分離精製を行なった。YMC GEL ODS-AM120-S50、20 mm i. d. × 500 mm のカラムを用い、展開溶媒として 50% アセトニトリル水溶液を用いた。594 ~ 648 ml に溶出される分画に化合物 (II - 1) が、 702 ~ 756 ml に溶出される分画に化合物 (I - 1) が溶出された。各分画を集め、減圧下濃縮し、アセトニトリルを除いた後、残渣を酢酸エチルで抽出、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮乾固して純粋な無色粉末の (II - 1) を 10 mg 、純粋な無色粉末の化合物 (I - 1) を 70 mg それぞれ得た。 (I - 1) は式 (I I) において R¹ および R² が水素である化合物であり、ケミカル

ル ファーマシューティックス ピューリチン (Chemical Pharmaceutics Bulletin, 24 (4), 613-620 (1976)) に記載の 4" - デオキシテルフェニリンであった。

化合物 (I-1) : R¹ = R² = OH

化合物名 : 3', 6' -ジメトキシ-4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)-[1, 1': 4', 1'']テルフェニル-3, 2', 4' -トリオール

性状 : 無色プリズム状結晶

溶解性 : アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに可溶 水に不溶

融点 : 155. 5 ~ 156°C

HR-LSIMS, m/z : 計算値 C₂₅H₂₆O₆: 422, 1728

実測値 : 422, 1730 [M]⁺

L SIMS, m/z : 422 [M]⁺

UV (メタノール) nm (ε) :

230 (sh), 277 (25, 700)

235 (sh), 297 (26, 200) 0. 01N-NaOH 添加

230 (sh), 276 (24, 500) 0. 01N-HCl 添加

IR cm⁻¹ (KBr) : 3393, 2932, 1611, 1588, 1522,

1490, 1117, 1071, 1001

¹H NMR (アセトン-d₆, 600 MHz) δ : 1. 77 (3H, br. s, like), 1. 79 (3H, br. s, like), 3. 37 (3H, s), 3. 73 (3H, s), 4. 63 (2H, br. d, like, J = 6. 6 Hz), 5. 52 (1H, m), 6. 49 (1H, s), 6. 83 (1H, dd, J = 2. 2, 8. 2 Hz), 6. 92 (1H, d, J = 2. 2 Hz), 6. 94 (2H, m), 6. 96 (1H, d, J = 8. 2 Hz), 7. 54 (2H, m), 7. 62 (1H, br. s), 7. 78 (1H, s), 8. 64 (1H, br. s)

¹³C NMR (アセトン-d₆, 150 MHz) δ : 18. 31 (q), 26. 00

(q), 56.04 (q), 60.67 (q), 66.18 (t), 103.85 (d), 112.75 (d), 116.06 (d), 117.61 (s), 118.97 (d), 121.44 (d), 123.15 (d), 127.91 (s), 130.48 (s), 130.85 (d), 133.54 (s), 137.50 (s), 140.04 (s), 146.23 (s), 146.79 (s), 149.24 (s), 154.51 (s), 157.79 (s)

TLC R_f 値 (濃硫酸試薬で検出) : 0.23 (トルエン : アセトニトリル = 85 : 15)

HPLC 分析 :

保持時間 : 5.6 分

カラム : YMC-Pack ODS-AM、AM-302、4.6 i. d.
× 150 mm (株式会社ワイエムシイ製)

移動相 : アセトニトリル : 水 = 55 : 45

流速 : 1 ml / 分

検出 : 280 nm (UV)

2-3. 化合物 (I-2) の精製

化合物 (I-2) 成分を含む 97 mg は中圧液体クロマトグラフィーに付した。YMC GEL ODS-AM 120-S5、20 mm i. d. × 500 mm のカラムを用い展開溶媒として 70% アセトニトリル水溶液を用いた。375 ~ 435 ml に溶出される分画を集め減圧下濃縮しアセトニトリルを除いた後、残渣を酢酸エチルで抽出、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮乾固して純粋な無色粉末の化合物 (I-2) を 70 mg 得た。

化合物 (I-2) : R¹ = H, R² = OH

化合物名 : 3', 6' -ジメトキシ-4-(3-メチル-2-ブテニルオキシ)-[1, 1'; 4', 1''] テルフェニル-3, 2' -ジオール

性状 : 無色粉末

溶解性：アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに可溶 水に不溶

HR-LSIMS, m/z : 計算値 C₂₅H₂₆O₅: 406.1779

実測値 : 406.1780 [M]⁺

L SIMS, m/z : 406 [M]⁺

UV (メタノール) nm (ϵ) :

225 (s h), 274 (17, 600)

225 (s h), 255 (s h), 295 (26, 200) O. O1N-Na

OH 添加

225 (s h), 273 (18, 000) O. O1N-HC1 添加

IR cm⁻¹ (KBr) : 3506, 3465, 2934, 1585, 1518,

1408, 1116, 1070, 1008

¹H NMR (アセトン-d₆, 600 MHz) δ : 1.77 (3H, s - like), 1.78 (3H, s - like), 3.38 (3H, s), 3.73 (3H, s), 4.63 (2H, br. d-like), 5.53 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.84 (1H, dd, J = 2.0, 8.2 Hz), 6.93 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.97 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.35 (1H, m), 7.44 (1H, s), 7.46 (2H, m), 7.65 (1H, s), 7.66 (2H, m)

¹³C NMR (アセトン-d₆, 150 MHz) δ : 18.34 (q), 26.00 (q), 56.26 (q), 61.04 (q), 66.44 (t), 104.45 (d), 113.10 (d), 118.63 (s), 119.07 (d), 121.56 (d), 123.28 (d), 127.96 (s), 128.25 (d), 129.35 (d), 129.84 (d), 133.85 (s), 137.70 (s), 139.65 (s), 140.46 (s), 146.50 (s), 147.07 (s), 149.40 (s), 154.78 (s)

TLC R_f 値 (濃硫酸試薬で検出) : 0.54 (トルエン : アセトニトリル = 8

5 : 1 5)

H P L C 分析 :

保持時間 : 1 3 . 5 分

カラム : Y M C - P a c k O D S - A M , A M - 3 0 2 , 4 . 6 i . d .
 × 1 5 0 m m (株式会社ワイエムシイ製)

移動相 : アセトニトリル : 水 = 5 5 : 4 5

流速 : 1 m l / 分

検出 : 2 8 0 n m (U V)

2 - 4 . 化合物 (I - 3) の精製

化合物 (I - 3) 成分を含む 1 2 8 m g はアセトニトリル 1 m l に加熱溶解させた後、室温放置により生ずる沈澱物を濾去後、濾液を濃縮乾固し残査 3 5 m g を得た。これを高速液体クロマトグラフィーにより分離精製した。 Y M C - P a c k O D S - A M , 2 0 m m i . d . × 1 5 0 m m のカラムを用い展開溶媒として 7 0 % アセトニトリル水溶液を用いた。1回の分取は 5 m g ずつを行い、 7 2 ~ 7 6 m l に溶出される分画を集めて減圧下濃縮し、アセトニトリルを除いた後、残渣を酢酸エチルで抽出、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮乾固して純粹な無色粉末の化合物 (I - 3) を 2 . 7 m g 得た。

化合物 (I - 3) : R ¹ = O H , R ² = O C H ₃

化合物名 : 3 , 3' , 6' - トリメトキシ - 4 - (3 - メチル - 2 - プテニルオキシ) - [1 , 1' ; 4' , 1' '] テルフェニル - 2' , 4' ' - ジオール

性状 : 無色粉末

溶解性 : アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに可溶 水に不溶

H R - L S I M S , m / z : 計算値 C ₂₆ H ₂₈ O ₆ : 4 3 6 . 1 8 8 4

実測値 : 4 3 6 . 1 8 8 0 [M] ⁺

L S I - M S , m / z : 4 3 6 [M] ⁺

U V (メタノール) n m (ε) :

230 (s h), 278 (25, 300)
 235 (s h), 295 (25, 100) 0. 01N-NaOH添加
 230 (s h), 278 (24, 500) 0. 01N-HCl添加
 I R c m⁻¹ (KBr) : 3430, 2432, 1612, 1522, 1488,
 1398, 1237, 1116, 1075

¹H NMR (アセトン-d₆, 600 MHz) δ : 1. 77 (3H, b, s like), 1. 79 (3H, br, s like), 3. 38 (3H, s), 3. 74 (3H, s), 3. 80 (3H, s), 4. 59 (2H, br, d like, J = 6. 7 Hz), 5. 53 (1H, m), 6. 50 (1H, s), 6. 93 (1H, dd, J = 2. 0, 8. 3 Hz), 6. 95 (2H, m), 6. 97 (1H, d, J = 8. 3 Hz), 6. 99 (1H, d, J = 2. 0 Hz), 7. 54 (2H, m), 7. 83 (1H, s), 8. 65 (1H, s)

¹³C NMR (アセトン-d₆, 150 MHz) δ : 18. 19 (q), 25. 84 (q), 56. 13 (q), 56. 16 (q), 60. 65 (q), 66. 18 (t), 104. 17 (d), 113. 80 (d), 116. 06 (d), 116. 42 (d), 117. 70 (s), 121. 63 (d), 124. 37 (d), 127. 73 (s), 130. 50 (s), 130. 79 (d), 133. 66 (s), 137. 40 (s), 140. 17 (s), 148. 37 (s), 149. 16 (s), 149. 98 (s), 154. 52 (s), 157. 80 (s)

TLC R_f 値 (濃硫酸試薬で検出) : 0. 34 (トルエン:アセトニトリル = 8. 5 : 1. 5)

HPLC 分析 :

保持時間 : 7. 4 分

カラム : YMC-Pack ODS-AM, AM-302, 4. 6 i. d.
 × 150 mm (株式会社ワイエムシイ製)

移動相 : アセトニトリル : 水 = 5. 5 : 4. 5

流速：1 ml／分

検出：280 nm (UV)

2-5. 化合物 (II-2) の精製

化合物 (II-2) 成分を含む粗精製物 0.577 g はシリカゲルクロマトグラフィー (Merck Kieselgel 60, 70~230 mesh, 2.4 mm i. d. × 200 mm) で精製を行った。粗精製物 0.577 g はトルエン：アセトニトリル (80:20) 3 ml に溶解し、同溶媒で展開し、Fr. 1~3 (120 ml) を集め減圧下濃縮し部分精製物 420 mgを得た。次に中圧液体クロマトグラフィーにより分離精製を行なった。YMC GEL ODS - AM 120-S 50, 20 mm i. d. × 500 mm のカラムを用い展開溶媒として 40% アセトニトリル水溶液を用いた。432~468 ml に溶出される分画を集め減圧下濃縮しアセトニトリルを除いた後、残渣を酢酸エチルで抽出、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮乾固して純粋な無色粉末の化合物 (II-2) を 90 mg 得た。化合物 (II-2) は式 (II) において R¹ がヒドロキシ、R² が水素である化合物であり、アグリカルチュアルバイオロジカルケミストリー (Agricultural Biological Chemistry, 49 (3), 867~868 (1985)) に記載のテルフェニリンであった。

2-6. 化合物 (II-3) の精製

化合物 (II-3) 成分を含む粗精製物 1.6 g はメタノール (6 ml) に溶解し、ノーリット SX-3 (和光純薬工業社製) (80 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌後、ノーリットを濾去して水 (14 ml) を加え、生じた沈殿を加熱溶解後、一晩室温放置する。生じた無色針状結晶を濾取し、純粋な化合物 (II-3) を 1.0 g 得た。化合物 (II-3) は式 (II) において R¹ および R² がヒドロキシである化合物であり、アグリカルチュアルバイオロジカルケミストリー (Agricultural Biological Chemistry, 49 (3), 867~868 (1985)) に記載の 3-ヒドロキシテル

フェニリンであった。

2-7. 化合物 (III) の精製

化合物 (III) を含む粗精製物 1.46 g はシリカゲルクロマトグラフィー (Merck Kieselgel 60, 70~230 mesh, 2.4 mm i. d. × 200 mm) で精製を行った。粗精製物 1.46 g はトルエン：アセトニトリル (80:20) 12 ml に溶解し、同溶媒で展開し、Fr. 4~8 (200 ml) を集め減圧下濃縮して純粋な無色粉末の化合物 (III) を 800 mg 得た。化合物 (III) はアグリカルチュアルバイオロジカルケミストリー (Agricultural Biological Chemistry, 49 (3), 867~868 (1985)) に記載の 3, 3'·ジヒドロキシテルフェニリンであった。

実施例 2 化合物 (II-3) を用いた化合物 (I-1) の製造

化合物 (II-3) 354 mg のアセトン (5 ml) 溶液に、無水炭酸カリウム 402 mg とプレニルプロマイド 149 mg をアセトン 2 ml と共に加え、室温下 6 時間攪拌した。不溶物を濾去後、濾液を減圧下濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物を中圧カラムクロマトグラフィー (カラム: YMC-GEL ODS-AM120-S5, 20 mm i. d. × 500 mm, 溶媒: 50% アセトニトリル水溶液) に付し、10 g ずつフラクションを集めた。Fr. 43~50 に化合物 (I-1) が溶出され、減圧下濃縮しアセトニトリルを除いた後、残渣を酢酸エチルで抽出、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮乾固して純粋な化合物 (I-1) を 138 mg 得た。

試験例 1 マウス脾細胞の試験管内マイトジエン反応における抑制効果

1-1. コンカナバリン A (Con A) 反応抑制効果

96 ウェルマイクロタイプレートの各ウェルに BDF1 マウス脾細胞 5×10^5 個を 0.1 ml の 10% 牛胎仔血清加 RPMI 1640 培地 (炭酸水素ナ

トリウム 2 mM、ベニシリン 50 単位 / ml、ストレプトマイシン 50 μg / ml および 2-メルカプトエタノール 5×10^{-5} M を添加)に浮遊したものを加え、その各ウェルにマイトジエンとして Con A 5 μg / ml と、化合物 (I-1)、化合物 (I-2)、化合物 (I-3) を種々の濃度で加え、各ウェルの最終容量を 0.2 ml とした。各本発明化合物は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、上記 RPMI 1640 培地にて希釈し最終濃度 100 ng / ml 以下になるように添加した。96 ウェルマイクロタイプレートは、湿度 100%、二酸化炭素 5%、空気 95% に保持された培養器内で 37°C、48 時間培養し、ハーベストする 6 時間前に ^3H -チミジン (18.5 KBq / ウェル) でパルスラベルし、培養終了後セルハーベスターにて細胞を回収し、細胞に取り込まれた放射能の量を測定して細胞増殖活性の指標とした。対照には Con A 無添加 (-ConA) を用いた。結果を表 1 に示す。

表 1

	(I-1)		(I-2)		(I-3)	
化合物濃度 (ng/ml)	放射活性 cpm \pm SD	抑制率 (%)	放射活性 cpm \pm SD	抑制率 (%)	放射活性 cpm \pm SD	抑制率 (%)
-ConA	3440 \pm 568	100	3440 \pm 568	100	3440 \pm 568	100
0	277061 \pm 7118	0	277061 \pm 7118	0	277061 \pm 7118	0
0.25	292470 \pm 542	-5.6	281904 \pm 6522	-1.8	285408 \pm 7252	-3.1
0.98	210046 \pm 3288	24.5	281371 \pm 10119	-1.6	266173 \pm 6208	4.0
3.91	56871 \pm 1554	80.5	191575 \pm 6969	30.9	101504 \pm 1326	64.2
15.6	11366 \pm 372	97.1	41660 \pm 531	86.0	20510 \pm 287	93.8
62.5	6411 \pm 246	98.9	11793 \pm 235	96.9	7755 \pm 624	98.4
250.0	6404 \pm 403	98.9	8233 \pm 254	98.2	7522 \pm 485	98.5
IC ₅₀ 値 (ng/ml)	1.2		5.6		2.0	

表 1 に示すように、化合物 (I-1)、(I-2) および (I-3) は、マウス脾細胞の Con A 反応を化合物濃度依存的に強く抑制した。

1 - 2. リボポリサッカライド反応抑制効果

上記 1 - 1 と同様の方法でコンカナバリン A をリボポリサッカライド (LPS, 10 μg/ml) に変え、反応の抑制効果を検討した。対照としては LPS 無添加 (-LPS) を用いた。結果を表 2 に示す。

表 2

	(I - 1)		(I - 2)		(I - 3)	
化合物濃度 (ng/ml)	放射活性 cpm ± SD	抑制率 (%)	放射活性 cpm ± SD	抑制率 (%)	放射活性 cpm ± SD	抑制率 (%)
-LPS	2939 ± 167	100	2939 ± 167	100	2939 ± 167	100
0	153851 ± 5649	0	153851 ± 5649	0	153851 ± 5649	0
0.98	153396 ± 6123	0.3	208023 ± 8941	-35.9	184366 ± 10625	-20.2
3.91	88405 ± 10394	43.4	132834 ± 5106	13.9	128436 ± 4167	16.8
15.6	32548 ± 315	80.4	78686 ± 4135	49.8	46765 ± 2209	71.0
62.5	16070 ± 944	91.3	39824 ± 651	75.6	22961 ± 1187	86.7
250.0	15046 ± 344	92.0	22312 ± 1122	87.2	14962 ± 866	92.0
IC ₅₀ 値 (ng/ml)	4.5		15.6		8.0	

表 2 に示すように、化合物 (I - 1)、(I - 2) および (I - 3) は、マウス脾細胞の LPS 反応を化合物濃度依存的に強く抑制した。

試験例 2 化合物 (I - 1) の細胞増殖抑制効果

96 ウエルマイクロタイタープレートの各ウェルに各種細胞株の細胞数を 0.1 ml のスケールで加え、試験例 1 と同じ培養条件下で 1 日前培養し、0 ~ 1000 ng/ml となるよう化合物 (I - 1) を 0.1 ml 添加した。そして 3 ~ 4 日間培養を続け、培養終了後、6 mg/ml の MTT [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド] (シグマ製) 溶液を 25 μl 各ウェルに加え、37 °C にて 4 時間同一条件下で培

養した。培養終了後、生成したホルマザンを、20%ドデシルナトリウムスルホン酸（SDS）の0.02N塩酸溶液を50μl加え37℃で24時間放置して溶解させた。生細胞数に比例して生成したホルマザンを、570nmのフィルターを装着したイムノリーダー（InterMed）で吸光強度（OD）を測定した。（ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド（The Journal of Immunological Method, 65巻, 55~63頁, 1983年参照）。そして、化合物（I-1）の濃度と吸光強度との相関より50%の細胞増殖阻止濃度（IC₅₀値）を算出した。結果を表3に示す。

表3

細胞名	由来	培地 ¹⁾	細胞数／ウェル	IC ₅₀ 値 (ng/ml)
CCD-19Lu	ヒト正常肺細胞	MEM	2×10 ⁴ 個	>10000
Lu-99	ヒト大細胞肺癌	RPMI 1640	2×10 ³ 個	1.0
CCFR-CEM	ヒト白血病	RPMI 1640	5×10 ³ 個	0.2
P388	マウス白血病	RPMI 1640	5×10 ² 個	12.0

培地¹⁾: MEMは、イーグルMEMに10%牛胎仔血清を加えた培地であり、RPMI 1640は、試験例1で示した培地であるが、ヒト由来の細胞には2-メルカプトエタノールは含まれていない。

表3に示すように化合物（I-1）は、正常肺細胞CCD-19Luには作用せず、腫瘍細胞に対してのみ強い細胞増殖抑制効果がみられた。

製剤例1

本発明化合物（I-1）	5.0mg
乳糖	4.6mg
トウモロコシデンプン	2.0mg
低置換度ヒドロキシプロピルセルロース	8mg
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	5mg
ステアリン酸マグネシウム	1mg

計

1 3 0 m g

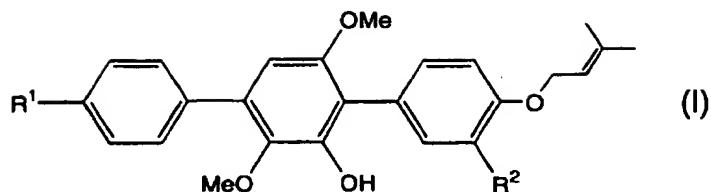
ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびステアリン酸マグネシウムを除く上記処方成分を均一に混合した後、ヒドロキシプロピルメチルセルロース 8 % (w / w) 水溶液を結合剤として湿式造粒法にて打錠用顆粒を調製した。これにステアリン酸マグネシウムを混合した後、打錠機を用いて直径 7 mm、1 錠重量 1 3 0 m g に形成し、内服錠とした。

発明の効果

以上の試験例から明らかなように、本発明化合物 (I) は強い免疫抑制作用、抗炎症作用および腫瘍細胞増殖抑制作用を示す。従って、本発明化合物 (I) は免疫抑制剤、抗炎症剤および抗癌剤として非常に有用である。

請求の範囲

1. 式 (I) :

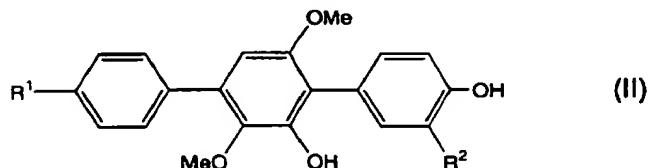


(式中、R¹は水素またはヒドロキシであり、R²はヒドロキシまたはメトキシである)

で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物。

2. アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、請求の範囲第1項記載の化合物を产生し得る微生物を培養し、得られた培養物から請求の範囲第1項記載の化合物を採取することを特徴とする該化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物の製造方法。

3. 式 (II) :



(式中、R¹は水素またはヒドロキシであり、R²はヒドロキシまたはメトキシである)

で示される化合物を3-メチル-2-ブテニル化することを特徴とする請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物の製造方法。

4. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を有効成分とする医薬。

5. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を有効成分とする免疫抑制剤。

6. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を有効成分とする抗炎症剤。
7. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を有効成分とする抗癌剤。
8. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を投与することを特徴とする免疫反応の抑制の方法。
9. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を投与することを特徴とする炎症の治療または予防の方法。
10. 請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を投与することを特徴とする癌の治療の方法。
11. 免疫反応の抑制、炎症の治療または予防および癌の治療のための医薬を製造するための、請求の範囲第1項記載の化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物の使用。
12. アスペルギルス カンディダス (*Aspergillus candidus*) に属し、請求の範囲第1項記載の化合物を产生する微生物。
13. アスペルギルス カンディダス RF-5762 (*Aspergillus candidus* RF-5762) (FERM BP-5882) である請求の範囲第12項記載の微生物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int. Cl⁶ C07C43/23, 41/01, C12P7/04, C12N1/14, A61K31/085 //
 (C12P7/04, C12R1:66) (C12N1/14, C12R1:66)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07C43/23, 41/01, C12P7/04, C12N1/14, A61K31/085 //
 (C12P7/04, C12R1:66) (C12N1/14, C12R1:66)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	The Journal of Antibiotics, Vol. 32, No. 6, (1979), I. Kurobane, et al. "3-Hydroxyterphenyllin, A new metabolite of Aspergillus Candidus" p. 559-564	1-7, 11-13
A	Agric. Biol. Chem., Vol. 49, No. 3, (1985), A. Kobayashi, et al. "p-Terphenyl with Cytotoxic Activity toward Sea Urchin Embryos" p. 867-868	1-7, 11-13
A	Chem. Pharm. Bull., Vol. 24, No. 4, (1976), C. Takahashi, et al. "The Structures of Toxic Metabolites of Aspergillus Candidus. I." p. 613-620	1-7, 11-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search June 24, 1997 (24. 06. 97)	Date of mailing of the international search report July 1, 1997 (01. 07. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01261

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl° C07C43/23, 41/01, C12P7/04, C12N1/14, A61K31/085 //
 (C12P7/04, C12R1:66) (C12N1/14, C12R1:66)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl° C07C43/23, 41/01, C12P7/04, C12N1/14, A61K31/085 //
 (C12P7/04, C12R1:66) (C12N1/14, C12R1:66)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	The Journal of Antibiotics, Vol.32, No.6, (1979) I.Kurobane, et al [3-Hydroxyterphenyllin, A new metabolite of Aspergillus Candidus] p.559-564	1-7, 11-13
A	Agric.Biol.Chem., Vol.49, No.3, (1985) A.Kobayashi, et al [p-Terphenyl with Cytotoxic Activity toward Sea Urchin Embryos] p.867-868	1-7, 11-13
A	Chem.Pharm.Bull., Vol.24, No.4, (1976) C.Takahashi, et al [The Structures of Toxic Metabolites of Aspergillus Candidus. I.] p.613-620	1-7, 11-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 06. 97

国際調査報告の発送日

01.07.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西川 和子

4H 7419

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3445

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 8-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲8-10は、治療による人体又は動物の体の処置方法であるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。